



牛结节性皮肤病病毒 ORF132 蛋白的原核表达及其对小鼠的免疫原性分析

顾晓晓¹, 刘紫威¹, 李红欢¹, 王文星¹, 马忠臣^{1,2,3*}, 陈创夫^{1,2,3*}

(1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832003; 2. 绵羊健康养殖与人兽共患病防控协同创新中心, 石河子 832003;
3. 石河子大学动物健康养殖国际联合研究中心, 石河子 832003)

摘要: 为研究牛结节性皮肤病病毒(lumpy skin disease virus, LSDV) ORF132 蛋白原核表达并评估其免疫效果。本研究将 LSDV ORF132 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达, 纯化。与弗式佐剂乳化耦合, 最终接种小鼠蛋白剂量为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$, 评估其 ELISA 定量的抗体滴度, 细胞免疫反应及淋巴细胞增殖水平。结果显示, ORF132 蛋白免疫组总 IgG 抗体滴度较高, IFN γ 分泌水平极显著高于 PBS 组。淋巴细胞增殖试验显示, ORF132 组能刺激小鼠淋巴细胞显著增殖且中和抗体效价较高。本研究通过小鼠免疫试验证明 ORF132 可以诱导较好的体液免疫和细胞免疫, 是具有免疫原性的优势候选抗原, 为后续开展多个抗原的联合免疫和牛体试验提供了素材。

关键词: 结节性皮肤病病毒; 原核表达; ORF132; 免疫效果评价

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1595-10

Prokaryotic Expression and Immunogenicity Analysis of the Lumpy Skin Disease Virus ORF132 Protein in Mice

GU Xiaoxiao¹, LIU Ziwei¹, LI Honghuan¹, WANG Wenxing¹, MA Zhongchen^{1,2,3*},
CHEN Chuangfu^{1,2,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2. Collaborative Innovation Center of Sheep Health Breeding and Zoonotic Disease Prevention and Control, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 3. International Joint Research Center for Animal Health, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: This study aimed to prokaryotically express the lumpy skin disease virus (LSDV) ORF132 protein and evaluate its immunogenicity. The ORF132 gene was expressed in *E. coli* BL21(DE3), purified, and emulsified with Freund's adjuvant. Mice were immunized with $100 \mu\text{g}$ of the protein per dose. The results demonstrated that the ORF132 protein elicited high titers of antigen-specific total IgG and a significantly elevated level of IFN- γ secretion compared to the PBS control group. Furthermore, it induced significant lymphocyte proliferation and a high neutralizing antibody titer. These findings indicate that the ORF132 protein is an immunodominant antigen capable of inducing robust humoral and cellular immune responses in mice, providing a promising candidate for

收稿日期: 2025-05-22

基金项目: 河北省重点研发计划项目(21322912D); 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZK202456); 新疆维吾尔自治区“天池英才”引进计划(BT-2025-TCYC-0067)

作者简介: 顾晓晓, 博士, 主要从事动物疫病诊断与防控技术研究, E-mail: gxxiao412@126.com

* 通信作者: 马忠臣, 主要从事人畜共患病致病机制与防控研究, E-mail: zhongchen_ma@163.com; 陈创夫, 主要从事病原分子致病机制和人畜共患病防治研究, E-mail: ccf-xb@163.com

subsequent multi-antigen combination studies and bovine trials.

Keywords: lumpy skin disease virus; prokaryotic expression; ORF132; evaluation of the immune effect

* **Corresponding authors:** MA Zhongchen, E-mail: zhongchen_ma@163.com; CHEN Chuangfu, E-mail: ccf-xb@163.com

牛结节性皮肤病(lumpy skin disease, LSD)是由牛结节性皮肤病病毒(lumpy skin disease virus, LSDV)引起的一种牛急性、亚急性、慢性的高度接触性传染病。该病可以引起感染的怀孕母牛流产甚至不孕、公牛暂时性失去孕育功能,产奶母牛产奶量下降,感染牛机体消瘦,因皮肤上布满结节而导致皮革利用率低。LSDV感染任何年龄阶段的牛,其中犊牛死亡率可达100%,成年牛的死亡率在3%~10%。该病的主要传播方式是通过吸血节肢昆虫为媒介,这些昆虫会随季节气候变化而进行大量繁殖和迁徙。因国际贸易往来逐年增加,货物运输工具的便利,也会导致该病的传播,增加了该病在全球传播的概率。

该病感染性强,传播广,无治疗药物,目前在我国没有同源疫苗,主要依靠异源弱毒疫苗对牛进行紧急免疫。异源弱毒疫苗来源于山羊痘病毒(goatpox virus, GTPV),因其具有良好的免疫原性,在我国已经被广泛用于绵羊痘和山羊痘的预防。然而由于GTPV的宿主特异性存在潜在感染绵羊、山羊的可能,同时弱毒疫苗的使用在注射部位易造成结节等不良反应。因此,研发更为安全有效的新型疫苗就显得尤为关键。

LSDV是一种包膜病毒,属于痘病毒科羊痘病毒属,是一种双链DNA病毒。LSDV的基因组大小为151 kb,由156个推定基因组成,其中146个基因是保守的,编码参与转录、mRNA生物合成、病毒颗粒结构和组装的蛋白质^[1]。ORF132是主要结构基因^[2-3],具有结构性或参与病毒粒子形态发生和组装的痘病毒蛋白同源物,通过调节免疫系统的反应和核苷酸生物合成在LSDV的发病机制中起着重要作用^[4]。了解LSDV ORF132的功能和免疫原性可以为有效疫苗的创建提供信息。在此基础上,本研究利用大肠杆菌表达系统制备ORF132蛋白,并与弗式佐剂耦合,进行免疫原性评价,旨在筛选免疫优势抗原,为后续开发安全有效的LSDV候选疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物和菌株

6周龄的雌性BALB/c小鼠购自新疆乌鲁木齐市子琦生物公司;DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存。经动物伦理委员会批准(批准号:A2025-013)。

1.2 主要试剂

BCA试剂盒购自赛默飞世尔科技公司;HRP-山羊抗小鼠IgG、HRP-山羊抗小鼠IgG1、HRP-山羊抗小鼠IgG2a购自武汉三鹰生物技术有限公司;CCK-8细胞增殖试剂盒购自全式金生物技术有限公司;小鼠脾脏淋巴细胞分离试剂盒购自天津灏洋生物公司;小鼠IFN- γ ELISpot试剂盒(ALP)购自Mabtech;弗式佐剂购自Sigma公司;ELISA包被液、ELISA显色液、ELISA终止液、10 $\times$ TBST购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 蛋白的理化性质、溶解度、抗原性、免疫原性、致敏性和毒性评估

ExPASy ProtParam服务器(<https://web.expasy.org/protparam/>)用于预测蛋白的物理化学性质^[5]。蛋白质溶胶服务器(<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>)用于预测所设计的蛋白的溶解度^[6]。ANTIGENpro服务器(<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>)^[7]和IEDB免疫原性服务器(<http://tools.iedb.org/immunogenicity/>)^[8]被用来预测所构建疫苗的抗原性和免疫原性。随后使用AllerScreener预测疫苗的致敏性和毒性(<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerScreener/screen/>)以及ToxinPred服务器(<https://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>)^[9]。

1.4 三级结构验证

将蛋白多肽的序列提交给适当的工具,并获得了其3D结构的精细模型AlphaFold2(<https://cryonet.ai/af2/>)。为了验证三级结构,SWISS-MODEL工作区执行了拉氏图。此外,ProSA-web还用于最终的疫苗蛋白质结构验证。

1.5 原核表达载体构建及重组蛋白的纯化

参照我国在新疆首次发现毒株 XJ201901 (OM984485.1), 密码子优化后, ORF132 基因由天津擎科生物技术有限公司合成, 克隆到 pCold-Ⅱ 载体中。提取质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取阳性克隆送至新疆有康生物技术有限公司测序。挑取单克隆菌落, IPTG 16 °C 诱导 20 h, 离心收集菌体, 将其重新悬浮于 15 mL PBS 缓冲液中, 然后在冰浴中超声破碎 45 min, 10 000 g 离心 10 min 以收集沉淀物。按照所述方法进行镍柱纯化^[10]。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定纯化, 并使用 BCA 蛋白测定试剂盒测量 562 nm 处的吸收值, 以 BSA 为标准蛋白, 检测蛋白质浓度。

1.6 重组蛋白 Western blot 鉴定

对重组蛋白进行 SDS-PAGE, 将重组蛋白转移

至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, TBST 洗涤 5 次, 加入 1:5 000 稀释的抗 His 抗体, 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 5 次, 加入 1:20 000 稀释的 HRP-山羊抗小鼠 IgG, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次后即可加入高敏 ECL 显色液, 避光放入双色激光成像分体系统中显色发光, 拍照保存。

1.7 疫苗制备和小鼠免疫程序

6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (无特定病原体) 被随机分配到不同的组。每只小鼠接种 100 μg 蛋白, 将磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的蛋白与完全弗氏佐剂 (Sigma) 按 1:1 耦合, 用于第一次疫苗接种; 与不完全弗氏佐剂 (Sigma) 耦合, 用于第二次 (第 14 天) 疫苗接种。分两组, ORF132 试验组和 PBS 对照组各 10 只小鼠。对照组注射等体积的 PBS, 在每次免疫接种之前, 对小鼠进行尾部采血以获取血清。

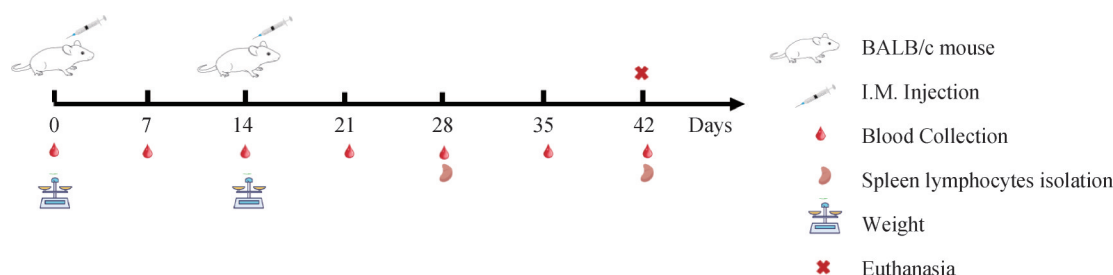


图1 免疫接种、血液和组织采样的时间线

Fig. 1 Timeline of immunization, blood and tissue sampling

1.8 ELISA 法检测血清抗体滴度

检测免疫小鼠血清中的蛋白特异性抗体 (IgG、IgG1 和 IgG2a)。ELISA 板在 4 °C 下用 100 μL·孔⁻¹重组蛋白包被过夜, 用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBST) 洗涤三次, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。去除封闭液后, 将稀释的血清样品加入板孔中, 37 °C 孵育 2 h。然后加入 HRP-山羊抗小鼠 IgG, 37 °C 孵育 1 h。加入 TMB 显色液, 20~30 min 后用 H₂SO₄ 停止反应。在微孔板读数器中读取 450 nm 处光密度 (OD)。

1.9 测定小鼠脾淋巴细胞 IFN-γ 水平

免疫接种后的 28 d 和 42 d, 使用小鼠淋巴细胞分离试剂盒分离小鼠脾脏淋巴细胞, 小鼠酶联免疫斑点 (ELISpot) 试剂盒检测 IFN-γ, RPMI-1640 培养基孵育 30 min, 2×10⁶ 个细胞·孔⁻¹铺板, 蛋白刺激, 淋巴细胞作为阴性对照, 100 μg·mL⁻¹ 刀豆蛋白 A 刺激脾细胞作为细胞活力对照, 37 °C 培养 36 h。用 ELISpot 阅读器计数斑点形成细胞 (SFCs)。

1.10 淋巴细胞增殖试验

免疫接种后的 28 d 和 42 d, 进行淋巴细胞增殖试验。每组 3 只小鼠的脾淋巴细胞接种到 96 孔 (每孔 2×10⁵ 个细胞) 中, 加入相应的蛋白 (100 μg·mL⁻¹), 37 °C 培养 36 h。RPMI-1640 的无细胞培养孔作为背景组, 及淋巴细胞作为阴性对照, 刀豆蛋白 A (ConA, 100 μg·mL⁻¹) 作为阳性对照。将 MTS 加入每孔, 在 37 °C 孵育 4 h。读取 450 nm 处的吸光度值。刺激指数测定如下: (蛋白刺激组 OD 值 - 背景组 OD 值) / (阴性对照组 OD 值 - 背景组 OD 值)。

1.11 实时荧光定量 PCR 检测免疫相关基因的 mRNA 表达

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测脾脏淋巴细胞中, Th2 型细胞因子 (IL-4)、促炎细胞因子 (IL-6)、抑制性细胞因子 (IL-10) 和先天性细胞因子 (TNF-α) 的 mRNA 转录水平。用于定量实时 PCR 的引物见表 1, 扩增条件: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s 和 60 °C 30 s, 40 个循环。相对 mRNA 表达水平通过 2^{-ΔΔC_t} 法计算^[2]。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 qRT PCR Primer Sequence

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5→3')	引物退火温度/℃ Primer annealing temperature
IL-4-F	ATGAATGAGTCCAAGTCCACATCAC	59.3
IL-4-R	GAGACCCTACGAGTAATCCATTTGC	58.1
IL-6-F	ACAGAAGGAGTGGCTAAGGA	58.2
IL-6-R	CGCACTAGGTTTGCCGAGTA	57.7
IL-10-F	GGACAACATACTGCTAACCGACTC	58.0
IL-10-R	ATTTCCGATAAGGCTTGGCAACC	58.0
TNF- α -F	TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC	57.3
TNF- α -R	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG	59.6
GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	58.5
GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	58.7

1.12 病毒中和抗体效价测定

将 MDBK 细胞约含 $1 \times 10^{4.0}$ 个细胞·孔⁻¹左右铺于 96 孔板内,待检血清 56 ℃灭活 30 min,用 DMEM 将血清进行 2 倍倍比系列稀释,每份血清至少 4 个平行重复,将已经测定好病毒毒价的牛结节皮肤病病毒稀释成 200TCID₅₀,设置阴阳性对照,37 ℃温箱孵育 1 h,连续观察 7 d,判定待检血清的病变情况,根据 Reed-Muench 法计算中和抗体效价。

1.13 统计分析

使用 GraphPad Prism 9.5.0 中进行 *t* 检验分析。所有试验重复 3 次。值表示为平均值±标准差(*s*)。 $P < 0.05$ 具有显著性,被认为有统计学意义,图中用星号表示的相应标记,其中*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, ****. $P < 0.0001$, ns. 无显著性。

表2 ORF132 蛋白一级序列的抗原性、过敏性和理化评估

Table 2 Antigenicity, allergenicity, and physicochemical evaluation of ORF132 protein primary sequence

病毒蛋白 Viral protein	氨基酸数量 Number of amino acids	相对分子质量/ku Molecular weight	理论 pI Theoretical pI	不稳定指数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	亲水性平均值 GRAVY	抗原性 Antigenicity	致敏性 Allergenicity	溶解度 Solubility
ORF132	161	17.69	7.05	18.51	94.35	-0.210	0.3083	PROBABLE ALLERGEN	0.539

2.2 重组载体验证及蛋白纯化表达

双酶切验证表明重组表达载体构建成功,得到符合大小的目的条带(图 3A),用 IPTG 诱导大肠杆

2 结果

2.1 蛋白的理化性质、溶解性、抗原性、免疫原性、致敏性和毒性

使用几种工具进行分析,以阐明 LSDV ORF132 蛋白的抗原性、过敏性和理化评估。结果显示 VaxiJen 2.0 和 ANTIGENpro 预测的抗原性为 0.3083, Allergen FP v. 1.0 和 AllerTop v. 2.0 显示候选蛋白无过敏性(表 2)。根据 Protein Sol 服务器的结果,候选蛋白的溶解度值为 0.539,表明溶解度适中。因此,以上数据表明,这些 LSDV 候选疫苗可能是有希望的针对牛结节性皮肤病病毒感染的疫苗。基于该序列,使用 Robetta 服务器对蛋白的三级结构进行建模。SWISS-MODEL 工作空间绘制的 Ramachandran 图显示,初始模型有 95.06% 的 Ramachandran 有利区域,0.22% 的 Ramachandran 异常区域和 0.23% 的 Rotamer 异常区域。

菌 BL21(DE3)和重组质粒 pCold II -ORF132 表达重组蛋白 20 h。通过 SDS-PAGE 检测 ORF132 的表达水平。在 IPTG 诱导的细胞中显示出相对分子

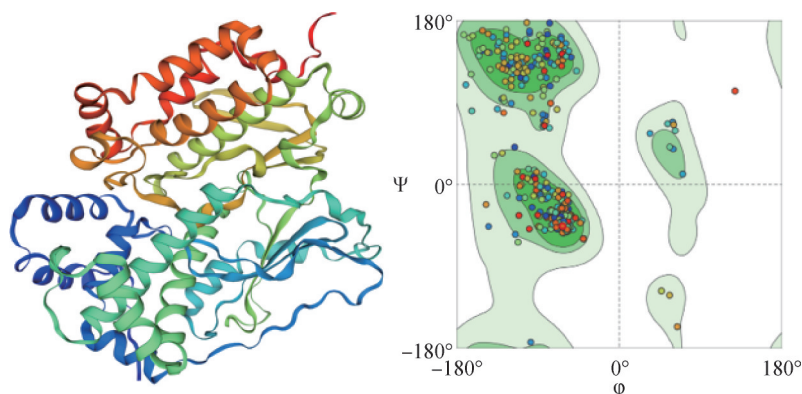
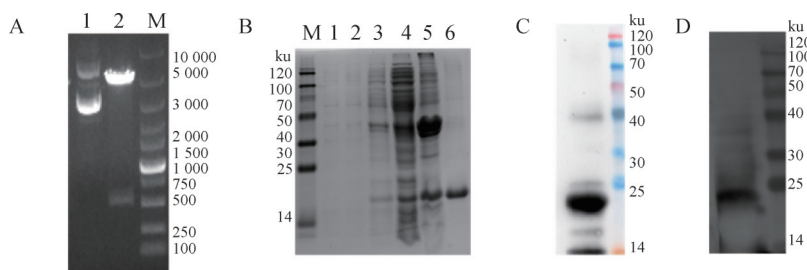


图2 ORF132蛋白三维模型及其拉式图

Fig. 2 Three-dimensional structural model of ORF132 protein and its corresponding Ramachandran plot

质量约为 17.69 ku 的独特条带(图 3B,泳道 6),图中显示的等于预测的蛋白(17.69 ku)和他的标签蛋白(约 0.8 ku)的总相对分子质量。此外,重组蛋白主

要存在于诱导细胞的包涵体中(图 3B,泳道 5), ORF132 正确表达且有很好的反应原性(图 3C、D),可用于免疫。



A. ORF132 表达载体的双酶切验证(*Bam*H I、*Xho* I)(M. DNA 相对分子质量标准;1. 原质粒;2. 质粒双酶切);B. SDS-PAGE(M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 未诱导 pCold II;2. 未诱导的 pCold II-ORF132;3. 诱导的 pCold II-ORF132;4. 诱导后超声处理的细胞上清液;5. 诱导后超声处理的细胞沉淀;6. 纯化蛋白);C. Western blot 检测重组蛋白;D. Western blot 检测小鼠血清反应原性

A. Double enzyme digestion validation of ORF132 expression vector (*Bam*H I, *Xho* I), (M. DNA marker; 1. Original plasmid; 2. Plasmid double enzyme digestion); B. SDS-PAGE (M. Protein marker; 1. Did not induce pCold II; 2. Did not induce pCold II-ORF132; 3. Induced pCold II-ORF132; 4. Induced ultrasound treated cell supernatant; 5. Induced ultrasound treated cell pellet; 6. Purified protein); C. Western blot detection of recombinant proteins; D. Western blot detection of mouse serum reactivity

图3 ORF132表达载体的验证及 SDS-PAGE、Western blot 验证

Fig. 3 Validation of ORF132 expression vector and SDS-PAGE, Western blot validation

2.3 小鼠血清中特异性抗体 IgG、IgG1、IgG2a 的表达水平

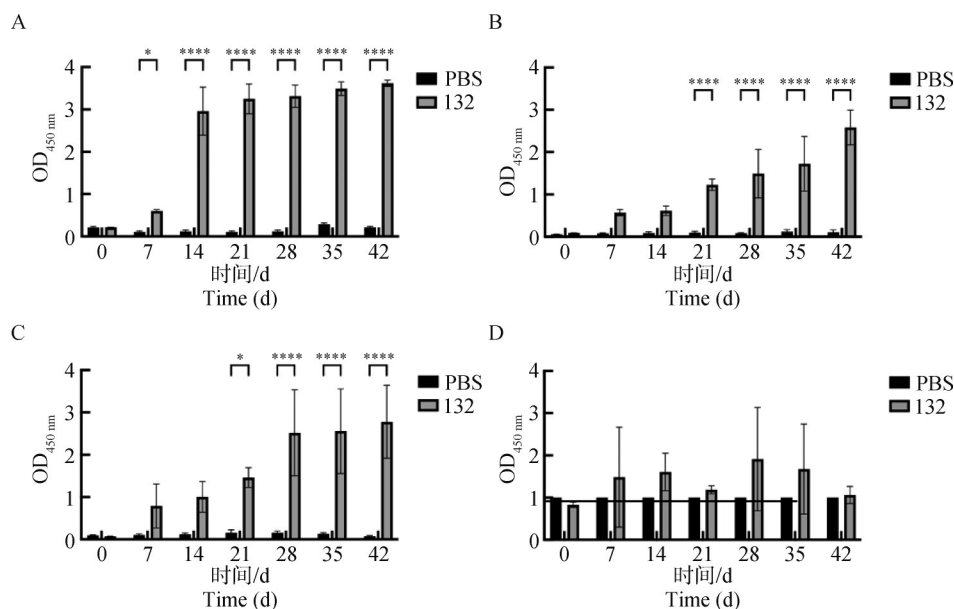
为了确定用重组蛋白免疫的小鼠是否能诱导针对重组抗原的特异性免疫反应,用分离自小鼠的血清进行间接 ELISA。检测总 IgG 和 IgG1、IgG2a 亚型抗体水平,以分析 0、7、14、21、28、35 和 42 dpi 时的免疫反应。首次免疫后,免疫组抗体水平保持较低水平,但与对照组显著差异($P < 0.05$)。加强免疫后,免疫组的抗体水平与初疫后的抗体水平相比极显著升高($P < 0.0001$);这表明,随着免疫周期

中时间的推移,免疫组的抗体水平不断升高。总 IgG 抗体水平 ORF132 在 14 d 迅速上升,随后保持稳定至 49 d 无下降趋势,试验组极显著高于 PBS 对照组($P < 0.0001$)(图 4)。同时 IgG1 的表达水平在 21 d 迅速升高,极显著高于 PBS 对照组($P < 0.0001$)。IgG2a 的表达水平也随着免疫时间的推移而逐步升高。

接着,使用抗体分型测定法测量特异性 IgG2a/IgG1 比值,以评估免疫应答中的 Th 1/Th 2 趋势。IgG2a/IgG1 值大于 1 时,说明免疫反应偏向 Th1 型

免疫应答,而小于1时说明偏向Th2型免疫应答。Th1反应的特征是细胞免疫和IgG2a抗体的产生。Th2反应的特征是体液免疫,特别是IgG1的产

生^[11]。在第一次免疫后IgG2a/IgG1比值大于1,42 d时接近1,Th1/Th2免疫应答相对平衡(图4)。



A. 小鼠血清IgG抗体变化趋势;B. 小鼠血清IgG1抗体变化趋势;C. 小鼠血清IgG2a抗体变化趋势;D. 小鼠血清IgG2a/G1抗体变化趋势。ns. $P>0.05$;*. $P<0.05$;**. $P<0.01$;***. $P<0.001$;****. $P<0.0001$,下图同

A. Trend of IgG antibody changes in mice sera; B. Trend of IgG1 antibody changes in mouse sera; C. Trend of IgG2a antibody changes in mice sera; D. Trend of IgG2a/G1 antibody changes in serum of D mice. ns. $P>0.05$;*. $P<0.05$;**. $P<0.01$;***. $P<0.001$;****. $P<0.0001$, the same as below

图4 小鼠血清IgG、IgG1和IgG2a抗体水平的变化

Fig. 4 Changes in serum IgG, IgG1, and IgG2a antibody levels in mice

2.4 小鼠脾淋巴细胞IFN- γ 分泌水平

在免疫28 d和42 d对小鼠脾脏进行取样。分离、收集脾脏中的淋巴细胞,并用重组蛋白的混合物刺激,以评估细胞免疫反应。如图5所示,28 d时ORF132组分泌IFN- γ 的脾细胞频率极显著高于PBS组($P<0.0001$)。同时,在免疫42 d时,免疫组脾淋巴细胞IFN- γ 的分泌比28 d时有上升的趋势,且极显著高于PBS组($P<0.001$)。以上结果表明,ORF132免疫可以诱导小鼠基于T细胞的细胞免疫反应增强。

2.5 小鼠脾淋巴细胞增殖分析

为了评估免疫小鼠脾脏中T淋巴细胞的增殖情况,我们用28 d和42 d时分离的脾脏淋巴细胞,检测其增殖反应。在相应蛋白的刺激下,免疫28 d时,增殖水平显著高于PBS对照组。免疫组显著高于PBS对照组,差异显著($P<0.05$)。同时在免疫42 d时,增殖水平显著高于PBS对照组($P<0.05$)。

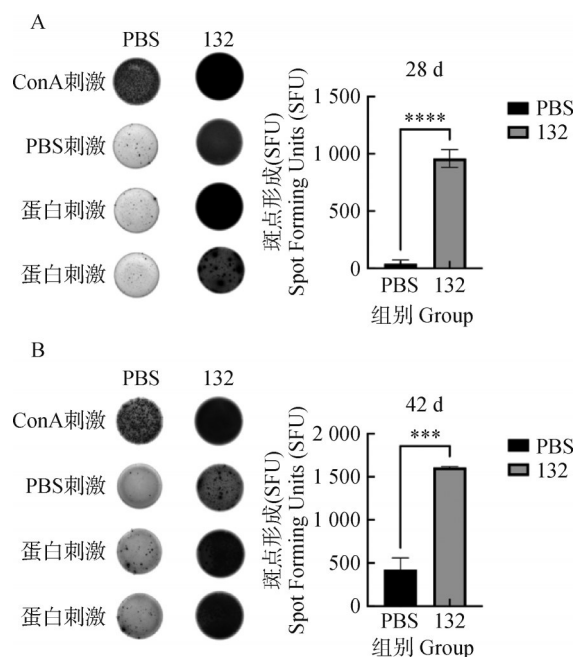
说明本试验脾脏淋巴细胞的活性良好,增殖速度加快,总体免疫细胞增殖快。

2.6 免疫相关基因的转录水平

通过qPCR检测脾脏淋巴细胞中免疫相关基因IL-4、IL-6、IL-10和TNF- α 的mRNA转录水平。IL-4、IL-6、TNF- α 细胞因子的相对转录水平两次免疫后初期上调,之后在42 d免疫组有所下降(图7)。具体而言,ORF132组转录水平相对于对照组最高达4倍($P<0.0001$)。而免疫组中抑炎因子IL-10转录水平42 d时显著升高($P<0.0001$)。总体看来,ORF132免疫促进了炎症因子的转录。

2.7 中和试验

使用免疫28 d和42 d的血清进行中和试验测定LSDV中和抗体效价,结果显示,在免疫后28 d和42 d,与PBS组相比,ORF132免疫组的中和抗体效价极显著差异($P<0.001$ 或 $P<0.0001$),PBS对照组无LSDV特异性抗体产生,42 d中和抗体水平

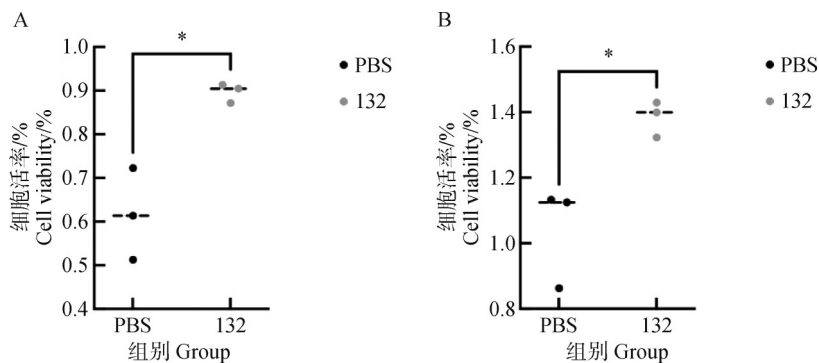


A. 免疫后 28 d 分泌 IFN- γ 的斑点数; B. 免疫后 42 d 分泌 IFN- γ 的斑点数

A. The number of spots secreting IFN- γ 28 days after immunization; B. The number of spots secreting IFN- γ 42 days after immunization

图 5 ELISpot 检测小鼠脾细胞 IFN- γ 分泌水平

Fig. 5 IFN- γ secretion levels in mouse splenocytes measured by ELISpot assay



A. 免疫后 28 d 时脾细胞活率; B. 免疫后 42 d 时脾细胞活率

A. Spleen cell viability at 28 days; B. Spleen cell viability at 42 days

图 6 CCK8 检测小鼠脾淋巴细胞增殖水平

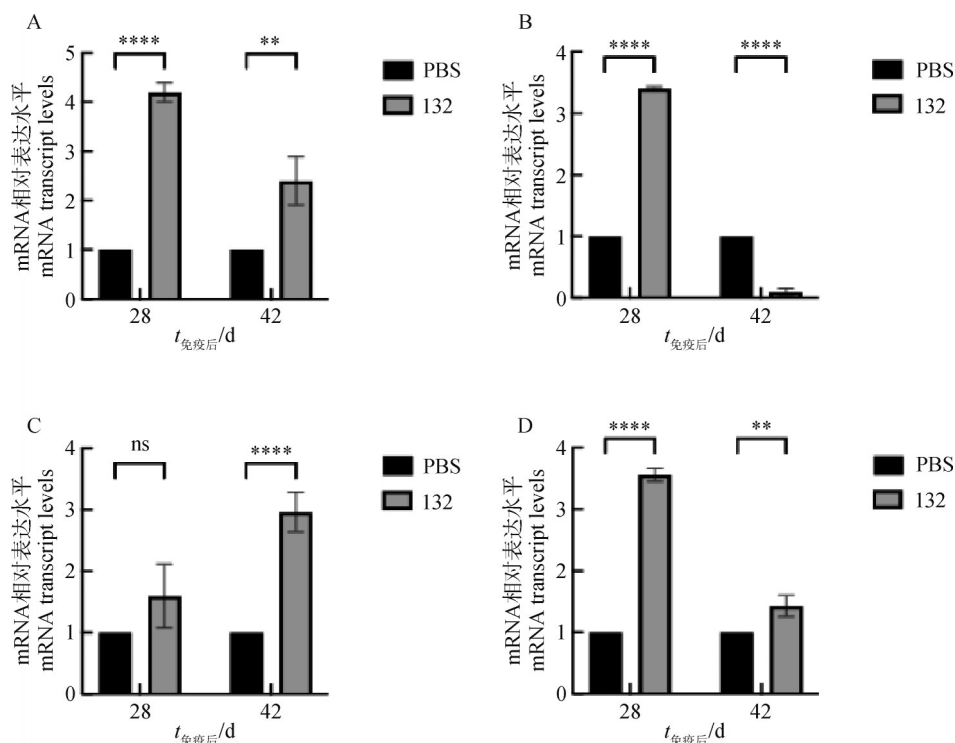
Fig. 6 CCK-8 assay assessing proliferation of murine splenic lymphocytes

相较于 28 d 显著升高 ($P < 0.01$), 结果见图 8。

3 讨论

结节性皮肤病是一种病毒性跨界动物疾病,是世界动物卫生组织 (WOAH, <https://www.woah.int/en/disease/lumpy-skin-disease/>) 规定的牛法定报告疾病之一,会造成严重的社会经济影响。2013 年, LSD 传播到欧洲,随后在 11 个欧洲国家传播,包括土耳其、希腊和俄罗斯^[12-14]。从 2019 年开始,中

亚及其邻近地区,如印度、孟加拉国、尼泊尔和中国,都报告了 LSD 的暴发^[14]。2019 年,中国首次在新疆西北部发现 LSD,此后不久,多个省份报告了 LSD 疫情^[15]。为了防止 LSDV 的进一步传播,必须大力进行疾病预防和控制,我国在受影响地区实施大规模的 GPTV 疫苗 (AV41 株) 接种活动^[16]。然而,各省的疫苗接种过程各不相同,没有有效的措施来控制吸血昆虫媒介,户外饲养、未接种疫苗或免疫功能低下的牛感染 LSDV 的风险。



A. IL-4; B. IL-6; C. IL-10; D. TNF-α

图7 小鼠脾脏淋巴细胞IL-4、IL-6、IL-10和TNF-α的mRNA转录水平

Fig. 7 Transcription levels of IL-4, IL-6, IL-10 and TNF-α in splenic lymphocytes of mice

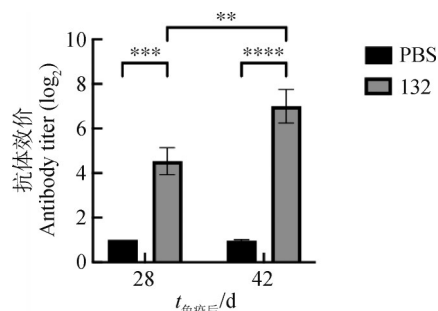


图8 抗体效价检测

Fig. 8 Detection of antibody

使用重组蛋白免疫是一种可行的方法。在细菌细胞中生产重组蛋白大大简化了这一过程,使所有阶段标准化并降低生产成本成为可能。LSDV蛋白的结构分析^[1]揭示了高度免疫原性的蛋白,基于pCold-II载体用于开发具有较高安全性和免疫应答的蛋白。然而,迄今为止,LSDV蛋白对抗体产生的影响鲜有报道。

ORF132是LSDV特异性基因,周雪梅^[16]和高源^[17]等的生物信息学分析及其原核、杆状病毒表达结果证明其是一种很好的候选抗原。本研究中,ORF132在小鼠免疫试验中具有较好的免疫原性。

ELISA试验结果表明ORF132蛋白在加强免疫后可以激起较高水平的IgG抗体免疫反应,IgG在体液免疫中起关键作用。Th1和Th2免疫反应是评价疫苗的重要指标,Th1细胞可促进宿主防御细胞内病原体所需的免疫反应,Th2细胞则促使免疫细胞产生抗体,对宿主防御细胞外病原体至关重要^[6]。ORF132蛋白引起的免疫反应偏向Th1型,目前在LSDV的报道中尚未提及Th1和Th2免疫反应的贡献,而有文献指出Th1免疫反应对于疫苗诱导针对RSV的保护性免疫反应至关重要^[18]。为了评估重组蛋白介导的先天性和适应性(细胞)免疫反应,使用ELISpot测定小鼠脾脏淋巴细胞量化了重组蛋白介导的IFN γ分泌,IFN γ主要由T、NK、NKT、抗原呈递细胞(MΦs和DC)和B细胞分泌。此外,抗原呈递和NK细胞分泌的IFN γ与早期宿主防御密切相关^[19]。Oh等^[20]报道,在加强免疫后表现出高IgG抗体滴度水平的接种疫苗的小鼠中,IFN γ的分泌可以被重新刺激,这表明蛋白诱导的保护与IgG抗体和IFN γ之间存在直接相关性。因此,重组蛋白有可能通过增强先天免疫反应和适应性(细胞和体液)免疫反应来引发较强的宿主防御。

细胞因子对适应性免疫和固有免疫具有重要调控作用,其动态变化与表达水平可作为机体免疫功能的评价指标。羊痘病毒感染时的巨噬细胞释放促炎性趋化因子和细胞因子^[21]。Th1 细胞的分化涉及 IL-12 和 IFN- γ ,而 Th2 细胞可以在 IL-4 主导的微环境中诱导。Th1 细胞可以进一步分泌“经典”Th1 细胞因子 TNF、IFN- γ 和 IL-2, Th2 细胞通常产生 IL-4、IL-5 和 IL-13^[22]。TNF- α 是调节病毒感染早期防御的重要细胞因子。TNF- α 与炎症的发生密切相关,并在疾病适应性免疫应答的协调和激活中发挥关键作用。由单核吞噬细胞等免疫细胞分泌的 TNF- α 等,是抵御外部病原攻击引发炎症反应的第一介质,其主要生理作用是诱导分化各种免疫细胞及产生各种趋化因子,并移至感染部分发挥免疫作用^[23]。因此, TNF- α 转录水平的显著上调对于机体作出免疫效应具有重要作用。Zeng 等^[24]已报道 GTPV 感染可增加炎症细胞因子,如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18。在本研究中,受刺激的脾细胞分泌细胞因子的结果表明,在相同的抗原剂量及佐剂下,我们发现免疫后动物的 IL-4、IL-6、TNF- α 水平都显著升高,这也与之前的研究一致^[25],随后下降趋于稳定。综上所述,表明疫苗可能同时诱导了有效的细胞免疫与体液免疫。

本研究针对 LSDV 设计了 132 蛋白原核表达,并对其可行性进行了验证,为今后的疫苗开发提供了新的思路。拥有着工艺已经成熟的疫苗开发平台,在生产质控上也相对成熟,同时也有着成本相对较低的优点。与传统灭活疫苗相比更高效,且比 mRNA 疫苗更安全,是较为理想的疫苗产品。本研究的一个明确局限在于其结论主要基于小鼠模型,而未在靶动物(牛)上进行直接验证。尽管我们精心设计了试验以模拟免疫应答,但牛作为反刍动物,其免疫系统的复杂性以及对疫苗佐剂的应答模式可能与小鼠存在本质差异。因此,本研究中观察到的免疫反应,在牛体内可能表现为不同的效果或强度。此外,我们无法在小鼠模型中评估该佐剂配方对 LSDV 攻击的实际保护率,这是评估其应用潜力的最终标准。

因此,一个清晰且必要的未来研究路径已经呈现:首先,需要在牛身上进行靶动物试验,以确认能否诱导出同样强劲且具有保护性的免疫反应。同时,应利用牛源细胞和特异性试剂,进一步探究在牛免疫系统中的具体作用靶点。我们相信,通过这

种从基础到临床应用的递进式研究策略,将最终实现本研究成果向有效防控工具的转化。

4 结 论

成功制备的 LSDV ORF132 蛋白不仅具有良好的安全性,而且在小鼠上具有较好的免疫原性,为 LSD 疫苗的研发奠定了理论基础,对 LSD 的防控提供候选材料。本研究的小鼠试验结果仅为该蛋白在牛身上的潜在应用提供参考和前期支持,其确切的疗效和安全性有待于在靶动物(牛)上进行进一步的验证。

参考文献(References):

- [1] TULMAN E R, AFONSO C L, LU Z, et al. Genome of lumpy skin disease virus[J]. *J Virol*, 2001, 75(15): 7122-7130.
- [2] NAVEED M, HASSAN J, AZIZ T, et al. A one-health approach to design an mRNA-based vaccine candidate against the lumpy skin disease virus as an alternative to live-attenuated vaccines [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023, 27(13): 6401-6413.
- [3] KAR P P, ARAVETI P B, KURIAKOSE A, et al. Design of a multi-epitope protein as a subunit vaccine against lumpy skin disease using an immunoinformatics approach[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 19411.
- [4] SCHLOSSER-PERRIN L, HOLZMULLER P, FERNANDEZ B, et al. Constitutive proteins of lumpy skin disease virion assessed by next-generation proteomics[J]. *J Virol*, 2023, 97(10): e0072323.
- [5] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 531-552.
- [6] HEBDITCH M, CARBALLO-AMADOR M A, CHARONIS S, et al. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(19): 3098-3100.
- [7] MAGNAN C N, ZELLER M, KAYALA M A, et al. High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(23): 2936-2943.
- [8] CALIS J J, MAYBENO M, GREENBAUM J A, et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity [J]. *PLoS Comput Biol*, 2013, 9(10): e1003266.
- [9] GUPTA A, SHARMA S, REICHENBACH P, et al.

- Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools[J]. *Genetics*, 2013, 193(4): 1095-105.
- [10] PEI C, GAO Y, SUN X, et al. A developed subunit vaccine based on fiber protein VP56 of grass carp reovirus providing immune protection against grass carp hemorrhagic disease [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2019, 90:12-19.
- [11] 崔耀丹, 宋 丽, 焦新安, 等. 新型冠状病毒受体结合域亚单位疫苗的制备及其免疫原性评价[J]. *中国兽医科学*, 2024, 54(12):1569-1576.
- CUI Y D, SONG L, JIAO X A, et al. Preparation and immunogenicity evaluation of SARS-CoV-2 receptor binding domain subunit vaccine [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2024, 54(12):1569-1576. (in Chinese)
- [12] ŞEVIK M, DOĞAN M. Epidemiological and molecular studies on lumpy skin disease outbreaks in Turkey during 2014-2015[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(4):1268-1279.
- [13] SPRYGIN A, VAN SCHALKWYK A, SHUMILOVA I, et al. Full-length genome characterization of a novel recombinant vaccine-like lumpy skin disease virus strain detected during the climatic winter in Russia, 2019[J]. *Arch Viro*, 2020, 165(11):26132-2677.
- [14] FLANNERY J, SHIH B, HAGA I R, et al. A novel strain of lumpy skin disease virus causes clinical disease in cattle in Hong Kong[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(4):e336-e343.
- [15] LU G, XIE J, LUO J, et al. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August. 2019 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(2):216-219.
- [16] 周雪梅. 牛疙瘩皮肤病毒 ORF132 的克隆、表达及生物信息学分析[D]. 重庆:西南大学, 2012.
- ZHOU X M. The cloning, expression and bioinformatic analysis of ORF132 gene of Lumpy shin. diease virus [D]. Chongqing: Southwest University, 2012. (in Chinese)
- [17] 高 源. LSDV ORF132 在昆虫杆状病毒中的表达及其免疫原性研究[D]. 重庆:西南大学, 2020.
- GAO Y. Expression and immunogenicity of LSDVORF132 in insect baculovirus system [D]. Chongqing: Southwest University, 2020. (in Chinese)
- [18] EICHINGER K M, KOSANOVICH J L, GIDWANI S V, et al. Prefusion RSV F immunization elicits Th2-mediated lung pathology in mice when formulated with a Th2 (but not a Th1/Th2-Balanced) adjuvant despite complete viral protection[J]. *Front Immunol*, 2020, 29(11):1673.
- [19] FRUCHT D M, FUKAO T, BOGDAN C, et al. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(10):556-560.
- [20] OH Y, FLEMING L, STATHAM B, et al. Interferon- γ induced by in vitro re-stimulation of CD4+ T-cells correlates with *in vivo* FMD vaccine induced protection of cattle against disease and persistent infection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e44365.
- [21] BABIUK S, BOWDEN T R, BOYLE D B, et al. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(7):263-272.
- [22] COCITO C, GILOT P, COENE M, et al. Paratuberculosis[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7(3): 328-345.
- [23] 汤青平. 灭活疫苗对半滑舌鳎部分免疫相关基因表达的影响研究[D]. 天津:天津农学院, 2020.
- TANG Q P. Effect of inactivated vaccine on partial immune related gene expression of *Cynoglossus semilaevis* [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [24] ZENG X, WANG S, CHI X, et al. Infection of goats with goatpox virus triggers host antiviral defense through activation of innate immune signaling[J]. *Res Vet Sci*, 2015, 104:40-49.
- [25] YANNI M I, ELDEN I M, KAMOURA N A, et al. Virological, molecular and immuno-biochemical studies of lumpy skin disease in naturally infected cattle [J]. *J Appl Vet Sci*, 2021, 6(1):28-37.

(编辑 白永平)